

PCT

ORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C07H 1/08, C12N 15/10, A61K 31/70</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/44759</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>3. August 2000 (03.08.00)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP00/00564</b>			(81) Bestimmungsstaaten: <b>JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b>
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>26. Januar 2000 (26.01.00)</b>			
(30) Prioritätsdaten: <b>199 03 507.5 29. Januar 1999 (29.01.99)</b>		DE	<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): <b>ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; D-68298 Mannheim (DE).</b>			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>GRIMM, Stefan [DE/DE]; Richard-Riemer-Schmid-Allee 7, D-81241 Muenchen (DE); NEUDECKER, Frank [DE/DE]; Treitschkestrasse 18, D-80992 München (DE).</b>			
(74) Gemeinsamer Vertreter: <b>ROCHE DIAGNOSTICS GMBH; Patentabteilung, D-68298 Mannheim (DE).</b>			

(54) Title: **METHOD FOR PRODUCING ENDOTOXIN-FREE NUCLEIC ACIDS AND THE USE THEREOF**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG ENDOTOXINFREIER NUKLEINSÄUREN UND DEREN VERWENDUNG**

(57) Abstract

The invention relates to a method for isolating and purifying nucleic acids and/or oligonucleotides from a biological sample. The invention also relates to the use of the isolated or purified nucleic acid for the transfection of cells and for the production of an agent for treating genetic diseases. The invention further relates to a composition which is suitable for the isolation process or purification process and to the use of potassium acetate and a silica-gel-like base material for isolating endotoxin-free or endotoxin-degraded nucleic acids and/or oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung

Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus einer biologischen Probe, Verwendung der isolierten bzw. gereinigten Nukleinsäure bzw. Oligonukleotide zur Transfektion von Zellen sowie zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen, eine für das Isolierungs- bzw. Reinigungsverfahren geeignete Zusammensetzung sowie die Verwendung von Kaliumacetat und ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial zur Isolierung von endotoxinfreier oder an Endotoxin abgereicherten Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden.

**VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG ENDOTOXINFREIER NUKLEINSÄUREN UND DEREN VERWENDUNG**

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus einer biologischen Probe, Verwendung der isolierten bzw. gereinigten Nukleinsäure bzw. Oligonukleotide zur Transfektion von Zellen sowie zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen, eine für das Isolierungs- bzw. Reinigungsverfahren geeignete Zusammensetzung sowie die Verwendung von Kaliumacetat und ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial zur Isolierung von endotoxinfreier oder an Endotoxin abgereicherter Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden.

Die Qualität isolierter Nukleinsäuren gewinnt zunehmend an Bedeutung. Hochreine Nukleinsäure-Fraktionen, d.h. von denen möglichst sämtliche anderen Zellbestandteile, wie beispielsweise Endotoxine abgetrennt sind, spielen eine zentrale Rolle in der Gentherapie bzw. bei der Transfektion von Zellen eukaryontischen oder auch prokaryontischen Ursprungs. Demzufolge wurden in den vergangenen Jahren vermehrt Verfahren bzw. Maßnahmen publiziert, die die Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischem Probenmaterial mit hohem Reinheitsgrad erlauben. Im wesentlichen kommen bei den bekannten Verfahren der Einsatz von Affinitäts- und/oder Anionenchromatographie-Materialien sowie nicht ionische Detergenzien oder auch verdünnte Lösungen höherer Alkohole zum Einsatz. Beispielsweise werden gemäß WO95/21177 die interessierenden Fraktionen einer Affinitätschromatographie oder einer Chromatographie an anorganischer Festphase, letzteres bevorzugt in Gegenwart eines nicht ionischen Detergentes, zur Entfernung von Endotoxinen unterzogen und anschließend mittels Anionenaustauscherchromatographie weiter gereinigt. Ein solches zweistufiges Chromatographie-Verfahren ist jedoch zeit- und materialaufwendig und daher mehr von akademischem Wert. Nach einem anderen Verfahren (WO95/21178) ist ebenfalls zwingend eine aufwendige Anionenaustauscherchromatographie erforderlich, um Rückstände zuvor zugesetzter komplexer Salzlösung abzutrennen.

Darüber hinaus ist seit längerem bekannt, daß DNA-Plasmide aus komplexen biologischen Proben eukaryontischen oder prokaryontischen Ursprungs durch die Bindung an Silicagel in Ge-

genwart chaotroper Salze, wie beispielsweise Guanidiniumhydrochlorid isoliert werden können (M.A. Marko et al., *Analyst. Biochem.* 121, (1982) 382-287; EP 0 389 063). Diese Verfahren sind jedoch nicht für die Gewinnung endotoxinärmer bzw. endotoxinfreier Nukleinsäurefraktionen geeignet. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Maßnahmen gemäß Marko et al. (1982) zu einem Endotoxingehalt von mehr als 10.000 U pro µg DNA führen. Eine solche endotoxinreiche DNA-Fraktion ist für die Transfektion von Zellen bei gentherapeutischen Anwendungen nicht geeignet.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von endotoxinfreien bzw. an Endotoxin abgereicherten Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, wodurch die Nachteile bekannter Verfahren, wie insbesondere aufwendige Säulenmaterialien, vermieden werden.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus biologischen Proben, wobei die jeweilige biologische Probe aufgeschlossen wird, dabei nicht gelöste Zell-Bestandteile in einer wäßrigen Kaliumacetat-Lösung resuspendiert, gegebenenfalls vorhandene unlösliche Bestandteile, beispielsweise durch Zentrifugation, abtrennt, die flüssige Phase mit einer ein Detergenz enthaltenden Alkohol-Lösung vermischt und inkubiert werden. Die Lösung wird anschließend mit einem Silicagel-ähnlichem Trägermaterial in Kontakt gebracht, die wäßrige Phase wird möglichst quantitativ von dem die Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide bindendem Trägermaterial abgetrennt – beispielsweise durch Absaugen oder Zentrifugieren – und das Trägermaterial mit der DNA wird anschließend ausreichend gewaschen. Als Waschlösung kann eine Alkohol-Lösung oder – was sich als besonders vorteilhaft herausgestellt hat – Aceton verwendet werden. Abhängig von dem Volumen der Ausgangsprobe ist eine Inkubationszeit für den Kontakt mit dem Trägermaterial von 10 bis maximal 40 Minuten bei Raumtemperatur ausreichend; erfindungsgemäß reichen in der Regel ca. 20 Minuten aus.

Dem Fachmann sind Silicagel-ähnliche Trägermaterialien prinzipiell bekannt. Erfindungsgemäß hat sich insbesondere eine Suspension von Siliciumdioxid als geeignet erwiesen. Eine Silicium-oxid-Suspension, welche durch Zugabe von Säure (z. B. Salzsäure) zu einer wäßrigen Suspension von Siliciumdioxid hergestellt und anschließend autoklaviert wurde, ist für das erfindungsge- mäße Verfahren besonders geeignet.

Die wäßrige Kaliumacetat-Lösung enthält Kaliumacetat bevorzugt in einem Konzentrationsbereich von ca. 1 bis 6 mol/l, wobei ein Bereich von 2 bis 4 mol/l und ein schwach saurer pH-Wert (ca. pH 4.5-6.8) erfindungsgemäß zu einer besonders hohen Qualität der Nukleinsäuren geführt hat.

Eine weitere vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, wenn der Probe nach Zugabe der Kaliumacetat-Lösung zusätzlich ein oder mehrere RNA-verdauende Enzyme, wie beispielsweise RNase A und/oder RNase T1, zugesetzt werden. Es hat sich insbesondere bei größeren Präparationen als vorteilhaft erwiesen, wenn das bzw. die RNA-verdauende(n) Enzym(e) im gleichen Medium/Puffer zugegeben wird, in dem zuvor das Kaliumacetat-Salz zugesetzt wurde. Alternativ, und zwar gilt dies insbesondere bei kleineren Ansätzen, können die RNA-verdauenden Enzyme auch bereits während des Aufschließens der biologischen Probe, d.h. zusammen mit dem Lyse-Puffer (z. B. zusammen mit Puffer P1 in Beispiel 1.2), zugegeben werden. Werden mehrere RNA-verdauende Enzyme zugesetzt, können diese in beliebigen Verhältnissen oder auch zu gleichen Teilen vorhanden sein. Die Endkonzentration an RNA-verdauenden Enzymen in dieser Lösung beträgt in der Regel bis bzw. um ca. 150 µg/ml; aber auch höhere Enzymkonzentrationen haben das erfindungsgemäße Verfahren nicht nachteilig beeinflußt.

In der Regel ist erfindungsgemäß bereits eine Inkubation für den Enzymverdau von 5 bis 10 Minuten bei 4°C, gegebenenfalls zunächst bei Raumtemperatur, mit der Kaliumacetat-Lösung ausreichend; abhängig von der Menge des eingesetzten Probenmaterials kann jedoch auch entsprechend länger inkubiert werden.

Erfindungsgemäß geeignete Alkohol-Lösungen sind insbesondere hochprozentige Lösungen höherer Alkohole, wie Isopropanol. Besonders vorteilhaft hat sich erfindungsgemäß erwiesen, wenn die Alkohol-Lösung nicht mit Wasser verdünnt ist, also nahezu zu 100% aus dem jeweiligen Alkohol besteht und zusätzlich ein oder mehrere ionische Detergenzien, und zwar in einer Konzentration von 0,5 bis 10% (w/v) enthält. Eine 100% Isopropanol-Lösung, welche ca. 1 bis 4% (w/v) SDS enthält, hat sich erfindungsgemäß als besonders geeignet erwiesen.

Der Aufschluß bzw. die Vorreinigung der biologischen Probe kann prinzipiell nach dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen. Alkalische Lysemaßnahmen sind erfindungsgemäß, insbesondere bei bakteriellen Wirtszellen, bevorzugt. Auf diese Weise können Proteinkomponenten und andere lösliche Bestandteile entfernt werden, bevor der Rückstand, der im wesentlichen Nu-

kleinsäurekomponenten und andere nicht lösliche Zellbestandteile enthält, mit der Kaliumacetat- bzw. Alkohol/Detergenz-Lösung in Kontakt gebracht wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Nukleinsäuren, wie beispielsweise Plasmid-DNA in hoher Qualität gewonnen werden, d.h. insbesondere mit einem Endotoxin-Gehalt von weniger als 100 U/ $\mu$ g DNA, in der Regel von maximal 10 U/ $\mu$ g DNA.

Insbesondere ist als überraschend anzusehen, daß die DNA nach alkalischer Lyse, ohne daß – wie im Stand der Technik beschrieben – die Zugabe chaotoper Substanzen erforderlich ist, mit hoher Effizienz an die Adsorptionsmatrix gebunden werden kann. Die Abwesenheit zugesetzter chaotoper Substanzen führt zu erheblichen Verbesserungen und Vereinfachungen bei der anschließenden Aufreinigungsprozedur der DNA bzw. der entsprechenden Transfektion von Zielzellen, und zwar sowohl bei Zellen eukaryontischen als auch prokaryontischen Ursprungs.

Darüber hinaus sind die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen endotoxinfreien bzw. an Endotoxin abgereicherten Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide zur Herstellung von Mitteln zur Behandlung von genetisch bedingten Krankheiten geeignet.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Mittel bzw. Zusammensetzungen zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus entsprechenden Wirtszellen, bei denen es sich beispielsweise um Mikrotiterplatten oder Blöcke handelt, die gegebenenfalls Minisäulen zur Aufreinigung der Plasmid-DNA enthalten können.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen enthalten im wesentlichen eine wäßrige Kaliumacetat-Lösung sowie eine ein Detergenz enthaltende Alkohol-Lösung und ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial. Darüber hinaus ist vorteilhaft, wenn eine für den Aufschluß einer biologischen Probe geeignete Lösung, insbesondere für die alkalische Lyse, vorhanden ist. Bevorzugte Ausführungsformen der Zusammensetzung sind, wenn die Kaliumacetat-Lösung das Salz in einem Konzentrationsbereich von ca. 1 bis 6 M, besonders bevorzugt von ca. 2 bis 4 M in einem schwach sauren Medium (pH ca. 4.5-6.8) aufweist, die Alkohol-Lösung Isopropanol mit ca. 0,5 bis 10% (w/v) eines ionischen Detergentes, wie beispielsweise SDS enthält und/oder es sich bei dem Trägermaterial um eine wäßrige Suspension von Siliciumdioxid handelt.

### Abbildung 1

Endotoxin(Lipopolysaccharid, LPS)-Gehalt in verschiedenen DNA-Plasmid-Fraktionen nach Aceton-Waschung ((c), (d)) und SDS-Fällung ((b), (d)). Die Plasmid-DNA wurde durch Bindung an Siliciumoxid isoliert und anschließend mit Isopropanol ((a), (b)) oder Aceton ((c), (d)) gewaschen, mit oder ohne LPS-Fällung in Gegenwart von SDS (2,5% in Isopropanol). Der LPS-Gehalt wurde colorimetrisch bestimmt, nach den Angaben des Herstellers (Boehringer Ingelheim, Deutschland).

- (a) Isopropanol/ohne SDS,
- (b) Isopropanol/mit SDS,
- (c) Aceton/ohne SDS,
- (d) Aceton/mit SDS

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

#### 1.1 Zellkultur und Transfektion

Babyhamster Nierenzellen (BHK) wurden in DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) ergänzt mit 5% fötalem Kälberserum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer befeuchteten 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Für Transfektionen wurden die Zellen in 24-Loch-Platten gegeben und mit 2 µg Plasmid-DNA nach der Calciumphosphat-Copräzipitationsmethode wie von Roussel et al. (Mol. Cell. Biol. 4 (1984), 1999-2009) beschrieben transfiziert. Hierfür wurden 25 µl DNA Lösung mit 25 µl 2 x HBS: 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 40 mM HEPES, 1.4 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,9 bei 4°C in einer 96-Loch-Platte mit einem 12-Kanal-Pipettierautomaten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermischt. Nach Zugabe von 20 µl einer 0,25 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung (4°C) und Mischen wurden 38 µl nach Inkubation für 25 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben.

Entsprechende Aliquots wurden in Löchern von 96-Loch-Blöcken (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 900 µl TB-Medium inkokuliert und für ca. 30 Stunden unter Schütteln bei 300 Upm kultiviert (37°C). Nach Identifizierung eines positiven Pools wurde die DNA zur Bestätigung des Ergebnisses erneut transfiziert. Die verbleibende DNA wurde zur Transformation von Bakterien für eine Plasmidisolierung im großen Maßstab verwendet.

### 1.2 Plasmidisolierung mit Säulen

96-Loch-Blöcke (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Bakterien wurden für 5 min bei 3000 g (Sigma Zentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Blöcke wurden für 2 bis 3 min umgekehrt auf saugfähiges Papiertuch gebracht. Dann wurden 170 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl/10 mM EDTA pH 8,0, 4°C) zugegeben und die Bakterienpellets wurden durch vollständige Vortexbehandlung für 10 bis 20 min resuspendiert. Nach Zugabe von 170 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde der Block mit Folie abgedichtet, umgedreht und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 170 µl von 4°C kaltem Puffer P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5, 4°C) beendet. Dann wurden 10 µl RnaseA-Lösung (1,7 mg/ml) zugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur und dann bei -20°C inkubiert und erneut für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Blöcke dekantiert und 100 µl Puffer P4 (2,5% (w/v) SDS in Isopropanol) wurden zugegeben. Der Block wurde einer Vortexbehandlung für 5 min unterzogen und zuerst für 15 min bei 4°C und dann für 15 min bei 20°C inkubiert. Die Blöcke wurden für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert und der Überstand wurde in eine Anordnung von 96 Säulen (Qiagen) in entsprechend zugeschnittene 96-Loch-Platten hergestellt worden war. Diese Platten wurden in Vakuumkammern (Qiagen) gestellt. Dann wurden 150 µl Siliciumoxid-Suspension zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert (die Siliciumoxid-Suspension wurde hergestellt durch Zugabe von 150 µl HCl (37%) zu 250 ml einer Suspension von 50 mg/ml SiO<sub>2</sub> (Sigma) und anschließendes Autoklavieren).

Nach Anlegen von Vakuum wurden die Säulen zweimal mit 600 µl Aceton (-20°C) gewaschen. Die 96-Loch-Säulenplatte wurde auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und für 4 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Die Säulenplatte wurde zuerst für 5 min bei 37°C und dann für 5 min in einer Vakuumkammer getrocknet. Dann wurde sie auf eine weitere Mikrotiterplatte gestellt. 70 µl bidestilliertes H<sub>2</sub>O (60°C) wurden zugegeben und dann erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 6000 Upm. Die Mikrotiterplatte wurde bei -20°C aufbewahrt.

### 1.3 Plasmidisolierung ohne Säulen

Das Verfahren erfolgte bis zur Zugabe des Puffers P4 wie unter Punkt 1.2 beschrieben. Dann wurde der Überstand nach Zentrifugation für 10 min bei 6000 Upm in 96-Loch-POM-Mikroti-

terblöcke (POM=Polyoxymethlen) gegeben, 150 µl Siliciumoxid-Suspension wurden zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden für 5 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert und 400 µl Aceton (-20°C) wurden zugegeben. Die Platten wurden erneut einer Vortexbehandlung (30 sec) unterzogen und für 3 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Dieser Acetonwaschvorgang wurde einmal wiederholt. Die Platten wurden zuerst bei Raumtemperatur für 5 min und dann für 5 min in einer Vakuumkammer getrocknet. Die Pellets wurden in 75 µl Wasser (60°C) resuspendiert und bei 6000 Upm und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplate bei -20°C aufbewahrt.

## 2. Ergebnisse

Aus den Bakterienkulturen wurde Plasmid-DNA unter Verwendung von Minisäulen (s. Punkt 1.2) isoliert. Ein entsprechendes Protokoll ohne Säulen ist unter Punkt 1.3 beschrieben.

Für den Transfektionsschritt ist es wichtig, Plasmid-DNA sehr hoher Reinheit zu erhalten. Hierzu wurde Siliciumdioxid als Bindematrix für Plasmid-DNA verwendet. Die Bindung von DNA an Siliciumdioxid in Anwesenheit chaotoper Substanzen ist bekannt (Vogelstein und Gillespie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 615-619). Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, daß selbst in Abwesenheit einer zugefügten chaotropen Substanz wie etwa Guanidinhydrochlorid die Plasmid-DNA mit ausreichender Kapazität an Siliciumdioxid bindet. Nach anschließendem Waschen in Aceton, gegebenenfalls unter Zusatz von SDS, konnte Plasmid-DNA in hervorragender Qualität – entsprechend einer Reinigung über einen Cäsiumchloridgradienten – erhalten werden. Üblicherweise wurden etwa 10 µg Plasmid-DNA aus 900 µl LB-Medium mit einer OD260/280 von mehr als 1,8 erhalten, wovon 90% in der supercoiled Form vorlagen.

## 3. Vergleich mit dem Stand der Technik

Versuch A: Bakterienkultur: *E.coli* HB101 pCMVbetaSportGAL, OD<sub>680</sub>/ml ca. 3.3

Es wurden in einem Doppelansatz je 1,8 ml Bakterienkultur mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1 754 777), welcher ein glasartiges Trägermaterial und ein stark chaotropes Salz enthält, aufgearbeitet und je 1,8 ml Bakterienkultur gemäß dem erfundungsgemäßen Verfahren prozessiert.

Das Ergebnis stellt sich wie folgt dar:

Ausbeute OD <sub>260nm</sub> :	Endotoxin-Gehalt (LAL Test)
High Pure 1 : 9,0 µg/100 µl endotoxinfreies Wasser	214 EU/µg Plasmid
High Pure 2 : 8,6 µg/100 µl endotoxinfreies Wasser	240 EU/µg Plasmid
Erfindung 1: 11,00 µg/100 µl endotoxinfreies Wasser	1,41 EU/µg Plasmid
Erfindung 2: 10,35 µg/100 µl endotoxinfreies Wasser	4,65 EU/µg Plasmid

Vorgehen gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens mit High Pure Filter Tube:

Die Bakterienkultur wurde für 30 sec. bei 13000 upm zentrifugiert und Überstand abgenommen.

Das Zellsediment von 1.8 ml Bakterienkultur wurde wie folgt weiterbehandelt:

1. Resuspendieren in 250 µl 50 mM Tris-HCl/10 mM EDTA, 100 µg RNase (DNase frei), pH 8.0, 4°C.
2. 250 µl 0.2 M NaOH, 1% SDS zugeben und das Gefäß 5-10 x invertieren, 5 min. bei RT.
3. 250 µl 3 M K-Acetat, pH 5.5 zugeben (4°C) und das Gefäß 5-10 x invertieren, 5 min. auf Eis inkubieren.
4. 10 min. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugieren (14000 rpm), Überstand abnehmen und 0,2 vol. (ca. 150 µl) 2.5% SDS in Isopropanol (z. B. 7 ml Isopropanol und 1 ml 20% SDS) zugeben und kurz vortexen, 15 min. bei 4°C inkubieren und anschließend 15 min. bei -20°C inkubieren.
5. 10 min. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugieren (14000 upm), Überstand abnehmen.
6. Überstand in High Pure Filter Tube pipettieren und 20 min. bei RT inkubieren.

7. 30 sec. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugieren (14000 upm), Durchlauf verwerfen und Filter Tube 2 x mit 700 µl eiskaltem Aceton waschen (Zwischen den Waschschritten 30 sec. bei 14000 upm zentrifugieren).
8. Nach dem letzten Waschschritt nochmals 30 sec. bei 14000 upm zentrifugieren, um das Vlies zu trocknen.
9. DNA durch Zugabe von 100 µl endotoxinfreiem Wasser und Inkubation für 10 min. bei RT eluieren. Um die DNA zu gewinnen wird 30-60 sec. bei voller Zentrifugationsgeschwindigkeit zentrifugiert.

Versuch B: Bakterienkultur: *E.coli* JM109pCMVbetaSportGal OD<sub>580</sub>/ml 2.37

Probe	Methode	Modifikation	Ausbeute [µg/100µg]	Endotoxin [EU/µg]
1 und 2	High Pure		9,3 / 9,3	371,7
3 und 4	High Pure	20 min. auf Vlies inkubiert 10 min. vor Elution inkubiert	12,8 / 12,2	2,18
5 und 6	Erfindung	Ohne Inkubationen	12,2 / 12,6	0,63

**Ergebnis:**

- Das erfindungsgemäße Verfahren zeigt eine ca. 100fache Reduktion des Endotoxinwertes.
- Ferner führt das erfindungsgemäße Verfahren mit schneller Durchzentrifugation zur gleichen Ausbeute wie mit Inkubation auf Vlies, damit kann die Zeit der Reinigung nun mit ca. 70 min. angegeben werden. Das erfindungsgemäße Verfahren mit schneller Durchzentrifugation zeigt darüber hinaus einen niedrigeren Endotoxinwert als nach der Inkubation auf Vlies.

**Patentansprüche**

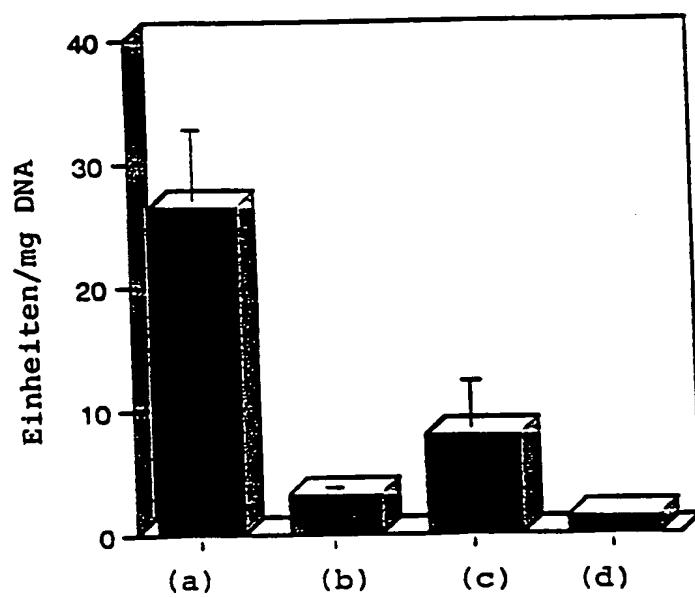
1. **Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, daß**
  - die biologische Probe aufgeschlossen, Proteinkomponenten und andere unlösliche Bestandteile abgetrennt werden,
  - zum Rückstand eine wäßrige Lösung an Kaliumacetat gegeben wird und nicht lösliche Bestandteile abgetrennt werden,
  - die mit Kaliumacetat versetzte Lösung mit einer ein Detergenz enthaltenden Alkohol-Lösung vermischt und inkubiert wird,
  - der erhaltene Überstand mit einem Silicagel-ähnlichen Trägermaterial in Kontakt gebracht und inkubiert wird, und
  - aus der löslichen Fraktion die gereinigten Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotide isoliert werden.
2. **Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Alkohol-Lösung um eine Mischung von Isopropanol mit einem ionischen Detergenz handelt.**
3. **Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Alkohol-Lösung ein oder mehrere ionische Detergenzien in einer Konzentration von 0,5 bis 10% (w/v) in 100%igem Alkohol enthält.**
4. **Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine wäßrige Lösung, die 1 bis 6 M Kaliumacetat enthält, verwendet wird.**
5. **Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung 2 bis 4 M Kaliumacetat enthält.**
6. **Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Silicagel-ähnliches Trägermaterial eine Suspension von Siliciumdioxid eingesetzt wird.**
7. **Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Silicagel-ähnliche Trägermaterial mit Aceton nachgewaschen wird.**

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß Plasmid-DNA mit einem Endotoxin-Gehalt von weniger als 100 U/µg erhalten wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Endotoxin-Gehalt maximal 10 U/µg Plasmid-DNA beträgt.
10. Endotoxinfreie oder an Endotoxin abgereicherte Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide erhältlich nach einem Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 9.
11. Verwendung von nach einem der Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 9 gewonnenen Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden zur Transfektion von eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen.
12. Verwendung von einer nach einem der Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 9 gewonnenen Nukleinsäure und/oder Oligonukleotiden zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen.
13. Zusammensetzung enthaltend folgende Komponenten:
  - mindestens eine für den Aufschluß einer biologischen Probe geeignete Lösung,
  - eine wäßrige Kaliumacetat-Lösung,
  - eine Detergenz/Alkohol-Lösung, und
  - ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial.
14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß folgende Komponenten enthalten sind:
  - eine für die alkalische Lyse von biologischem Probenmaterial geeignete Lösung,
  - eine Salz-Lösung, die 1 bis 6 M Kaliumacetat enthält,
  - eine Alkohol-Lösung enthaltend 0,5 bis 10% (w/v) SDS in 100%igem Isopropanol und
  - ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Suspension von Siliciumdioxid als Trägermaterial enthalten ist.

16. Verwendung von Kaliumacetat zur Isolierung, Reinigung und/oder Trennung von endotoxinfreier oder an Endotoxin abgereicherter Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus bzw. von einer vorgereinigten biologischen Probe.

1/1

Abbildung 1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 00/00564A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07H/08 C12N15/10 A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07H C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PRAZERES D M F ET AL: "Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, vol. 806, no. 1, 8 May 1998 (1998-05-08), pages 31-45, XP004121166 ISSN: 0021-9673 the whole document — —/—	1-5, 8, 10-12, 16

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2000

Date of mailing of the international search report

10/05/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scott, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP 00/00564

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEVISON P R ET AL: "New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, vol. 827, no. 2, 11 December 1998 (1998-12-11), pages 337-344, XP004153868 ISSN: 0021-9673 abstract page 338, column 2, line 14 -page 339, column 2, line 42	1-5,8, 10-12,16
A	WO 95 21179 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); MORITZ PETER (DE); SCHORR JOACHIM) 10 August 1995 (1995-08-10)	1,11-13, 16
X	claims 1,7; examples 1,2	10
A	WO 95 21178 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); SCHORR JOACHIM (DE)) 10 August 1995 (1995-08-10) cited in the application claims 1-10; examples 1,2	1,10-13, 16
A	WO 95 21177 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); MORITZ PETER (DE); SCHORR JOACHIM) 10 August 1995 (1995-08-10) cited in the application the whole document	1,11-13, 16
A	WO 93 08894 A (COULTER CORP) 13 May 1993 (1993-05-13) the whole document	1,11-13, 16 10
A	WO 89 07603 A (MEMORIAL BLOOD CENTER OF MINNE) 24 August 1989 (1989-08-24) page 1, line 1 -page 2, line 17 page 8, line 1 -page 10, line 34; claims 1-17	1,10-13, 16
A	US 4 833 239 A (RIEDEL GERARD E ET AL) 23 May 1989 (1989-05-23) claim 1	1,10-13, 16
A	WO 91 02740 A (UNIV TEXAS) 7 March 1991 (1991-03-07) page 8, line 8 - line 35; claims 1,16-20,24,33; example 1	1,10-13, 16
-/-		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l	Application No
PCT/EP 00/00564	

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEVISON P R ET AL: "Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, vol. 816, no. 1, 7 August 1998 (1998-08-07), pages 107-111, XP004145838 ISSN: 0021-9673 the whole document -----	1,10-13, 16
P,X	PRAZERES D M F ET AL: "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, vol. 17, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 169-174, XP004162836 ISSN: 0167-7799 the whole document -----	1,2,10, 12,16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Inte Application No

PCT/EP 00/00564

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9521179	A 10-08-1995	DE 4432654	A	21-03-1996
		AT 181921	T	15-07-1999
		AT 179425	T	15-05-1999
		AT 187733	T	15-01-2000
		AU 684134	B	04-12-1997
		AU 1577695	A	21-08-1995
		AU 693511	B	02-07-1998
		AU 1577795	A	21-08-1995
		AU 691574	B	21-05-1998
		AU 1664695	A	21-08-1995
		CA 2182388	A	10-08-1995
		CA 2182397	A	10-08-1995
		CA 2182398	A	10-08-1995
		DE 59505786	D	02-06-1999
		DE 59506355	D	12-08-1999
		DE 59507433	D	20-01-2000
		WO 9521177	A	10-08-1995
		WO 9521178	A	10-08-1995
		EP 0743948	A	27-11-1996
		EP 0775150	A	28-05-1997
		EP 0743949	A	27-11-1996
		JP 9508406	T	26-08-1997
		JP 9508283	T	26-08-1997
		JP 9508407	T	26-08-1997
		US 5747663	A	05-05-1998
		US 5990301	A	23-11-1999
		US 5792651	A	11-08-1998
		AU 1664795	A	29-03-1996
		WO 9608500	A	21-03-1996
		EP 0781291	A	02-07-1997
WO 9521178	A 10-08-1995	DE 4432654	A	21-03-1996
		AT 181921	T	15-07-1999
		AU 684134	B	04-12-1997
		AU 1577695	A	21-08-1995
		CA 2182398	A	10-08-1995
		DE 59506355	D	12-08-1999
		EP 0743948	A	27-11-1996
		JP 9508283	T	26-08-1997
		US 5792651	A	11-08-1998
		AT 179425	T	15-05-1999
		AT 187733	T	15-01-2000
		AU 693511	B	02-07-1998
		AU 1577795	A	21-08-1995
		AU 691574	B	21-05-1998
		AU 1664695	A	21-08-1995
		CA 2182388	A	10-08-1995
		CA 2182397	A	10-08-1995
		DE 59505786	D	02-06-1999
		DE 59507433	D	20-01-2000
		WO 9521177	A	10-08-1995
		WO 9521179	A	10-08-1995
		EP 0775150	A	28-05-1997
		EP 0743949	A	27-11-1996
		JP 9508406	T	26-08-1997
		JP 9508407	T	26-08-1997
		US 5747663	A	05-05-1998
		US 5990301	A	23-11-1999

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Int'l application No

PCT/EP 00/00564

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9521178	A	AU	1664795 A	29-03-1996
		WO	9608500 A	21-03-1996
		EP	0781291 A	02-07-1997
WO 9521177	A 10-08-1995	DE	4432654 A	21-03-1996
		AT	181921 T	15-07-1999
		AT	179425 T	15-05-1999
		AT	187733 T	15-01-2000
		AU	684134 B	04-12-1997
		AU	1577695 A	21-08-1995
		AU	693511 B	02-07-1998
		AU	1577795 A	21-08-1995
		AU	691574 B	21-05-1998
		AU	1664695 A	21-08-1995
		CA	2182388 A	10-08-1995
		CA	2182397 A	10-08-1995
		CA	2182398 A	10-08-1995
		DE	59505786 D	02-06-1999
		DE	59506355 D	12-08-1999
		DE	59507433 D	20-01-2000
		WO	9521178 A	10-08-1995
		WO	9521179 A	10-08-1995
		EP	0743948 A	27-11-1996
		EP	0775150 A	28-05-1997
		EP	0743949 A	27-11-1996
		JP	9508406 T	26-08-1997
		JP	9508283 T	26-08-1997
		JP	9508407 T	26-08-1997
		US	5747663 A	05-05-1998
		US	5990301 A	23-11-1999
		US	5792651 A	11-08-1998
		AU	1664795 A	29-03-1996
		WO	9608500 A	21-03-1996
		EP	0781291 A	02-07-1997
WO 9308894	A 13-05-1993	US	5221483 A	22-06-1993
		AU	666682 B	22-02-1996
		AU	2932392 A	07-06-1993
		AU	4058595 A	04-04-1996
		CA	2121236 A	13-05-1993
		EP	0630280 A	28-12-1994
		JP	7500533 T	19-01-1995
WO 8907603	A 24-08-1989	EP	0403503 A	27-12-1990
		JP	3503481 T	08-08-1991
US 4833239	A 23-05-1989	CN	1047533 A, B	05-12-1990
WO 9102740	A 07-03-1991	US	5128247 A	07-07-1992
		AU	6432490 A	03-04-1991
		CA	2064068 A	15-02-1991
		EP	0487646 A	03-06-1992

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen  
PCT/EP 00/00564

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07H1/08 C12N15/10 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
IPK 7 C07H C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	PRAZERES D M F ET AL: "Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, Bd. 806, Nr. 1, 8. Mai 1998 (1998-05-08), Seiten 31-45, XP004121166 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument	1-5, 8, 10-12, 16

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Tätigkeit oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipielle oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschusses der Internationalen Recherche

Abschlußdatum des Internationalen Recherchenberichts

28. April 2000

10/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scott, J

INTERNATIONALER ~~SEARCH~~ SERCHENBERICHTInte ~~SEARCH~~ Aktenzeichen

PCT/EP 00/00564

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEVISON P R ET AL: "New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, Bd. 827, Nr. 2, 11. Dezember 1998 (1998-12-11), Seiten 337-344, XP004153868 ISSN: 0021-9673 Zusammenfassung Seite 338, Spalte 2, Zeile 14 -Seite 339, Spalte 2, Zeile 42	1-5,8, 10-12,16
A	WO 95 21179 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); MORITZ PETER (DE); SCHORR JOACHIM) 10. August 1995 (1995-08-10)	1,11-13, 16
X	Ansprüche 1,7; Beispiele 1,2	10
A	WO 95 21178 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); SCHORR JOACHIM (DE)) 10. August 1995 (1995-08-10) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-10; Beispiele 1,2	1,10-13, 16
A	WO 95 21177 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); MORITZ PETER (DE); SCHORR JOACHIM) 10. August 1995 (1995-08-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1,11-13, 16
A	WO 93 08894 A (COULTER CORP) 13. Mai 1993 (1993-05-13)	1,11-13, 16
X	das ganze Dokument	10
A	WO 89 07603 A (MEMORIAL BLOOD CENTER OF MINNE) 24. August 1989 (1989-08-24) Seite 1, Zeile 1 -Seite 2, Zeile 17 Seite 8, Zeile 1 -Seite 10, Zeile 34; Ansprüche 1-17	1,10-13, 16
A	US 4 833 239 A (RIEDEL GERARD E ET AL) 23. Mai 1989 (1989-05-23) Anspruch 1	1,10-13, 16
A	WO 91 02740 A (UNIV TEXAS) 7. März 1991 (1991-03-07) Seite 8, Zeile 8 - Zeile 35; Ansprüche 1,16-20,24,33; Beispiel 1	1,10-13, 16
		-/-

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LEVISON P R ET AL: "Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, Bd. 816, Nr. 1, 7. August 1998 (1998-08-07), Seiten 107-111, XP004145838 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument	1,10-13, 16
P,X	PRAZERES D M F ET AL: "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Bd. 17, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 169-174, XP004162836 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument	1,2,10, 12,16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. Aktenzeichen  
PCT/EP 00/00564

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9521179	A 10-08-1995	DE 4432654	A	21-03-1996
		AT 181921	T	15-07-1999
		AT 179425	T	15-05-1999
		AT 187733	T	15-01-2000
		AU 684134	B	04-12-1997
		AU 1577695	A	21-08-1995
		AU 693511	B	02-07-1998
		AU 1577795	A	21-08-1995
		AU 691574	B	21-05-1998
		AU 1664695	A	21-08-1995
		CA 2182388	A	10-08-1995
		CA 2182397	A	10-08-1995
		CA 2182398	A	10-08-1995
		DE 59505786	D	02-06-1999
		DE 59506355	D	12-08-1999
		DE 59507433	D	20-01-2000
		WO 9521177	A	10-08-1995
		WO 9521178	A	10-08-1995
		EP 0743948	A	27-11-1996
		EP 0775150	A	28-05-1997
		EP 0743949	A	27-11-1996
		JP 9508406	T	26-08-1997
		JP 9508283	T	26-08-1997
		JP 9508407	T	26-08-1997
		US 5747663	A	05-05-1998
		US 5990301	A	23-11-1999
		US 5792651	A	11-08-1998
		AU 1664795	A	29-03-1996
		WO 9608500	A	21-03-1996
		EP 0781291	A	02-07-1997
WO 9521178	A 10-08-1995	DE 4432654	A	21-03-1996
		AT 181921	T	15-07-1999
		AU 684134	B	04-12-1997
		AU 1577695	A	21-08-1995
		CA 2182398	A	10-08-1995
		DE 59506355	D	12-08-1999
		EP 0743948	A	27-11-1996
		JP 9508283	T	26-08-1997
		US 5792651	A	11-08-1998
		AT 179425	T	15-05-1999
		AT 187733	T	15-01-2000
		AU 693511	B	02-07-1998
		AU 1577795	A	21-08-1995
		AU 691574	B	21-05-1998
		AU 1664695	A	21-08-1995
		CA 2182388	A	10-08-1995
		CA 2182397	A	10-08-1995
		DE 59505786	D	02-06-1999
		DE 59507433	D	20-01-2000
		WO 9521177	A	10-08-1995
		WO 9521179	A	10-08-1995
		EP 0775150	A	28-05-1997
		EP 0743949	A	27-11-1996
		JP 9508406	T	26-08-1997
		JP 9508407	T	26-08-1997
		US 5747663	A	05-05-1998
		US 5990301	A	23-11-1999

**INTERNATIONALER RECHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur gleichen Patentfamilie gehören

Inte Aktenzeichen  
PCT/EP 00/00564

im Rechenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9521178 A		AU 1664795 A		29-03-1996
		WO 9608500 A		21-03-1996
		EP 0781291 A		02-07-1997
WO 9521177 A	10-08-1995	DE 4432654 A		21-03-1996
		AT 181921 T		15-07-1999
		AT 179425 T		15-05-1999
		AT 187733 T		15-01-2000
		AU 684134 B		04-12-1997
		AU 1577695 A		21-08-1995
		AU 693511 B		02-07-1998
		AU 1577795 A		21-08-1995
		AU 691574 B		21-05-1998
		AU 1664695 A		21-08-1995
		CA 2182388 A		10-08-1995
		CA 2182397 A		10-08-1995
		CA 2182398 A		10-08-1995
		DE 59505786 D		02-06-1999
		DE 59506355 D		12-08-1999
		DE 59507433 D		20-01-2000
		WO 9521178 A		10-08-1995
		WO 9521179 A		10-08-1995
		EP 0743948 A		27-11-1996
		EP 0775150 A		28-05-1997
		EP 0743949 A		27-11-1996
		JP 9508406 T		26-08-1997
		JP 9508283 T		26-08-1997
		JP 9508407 T		26-08-1997
		US 5747663 A		05-05-1998
		US 5990301 A		23-11-1999
		US 5792651 A		11-08-1998
		AU 1664795 A		29-03-1996
		WO 9608500 A		21-03-1996
		EP 0781291 A		02-07-1997
WO 9308894 A	13-05-1993	US 5221483 A		22-06-1993
		AU 666682 B		22-02-1996
		AU 2932392 A		07-06-1993
		AU 4058595 A		04-04-1996
		CA 2121236 A		13-05-1993
		EP 0630280 A		28-12-1994
		JP 7500533 T		19-01-1995
WO 8907603 A	24-08-1989	EP 0403503 A		27-12-1990
		JP 3503481 T		08-08-1991
US 4833239 A	23-05-1989	CN 1047533 A, B		05-12-1990
WO 9102740 A	07-03-1991	US 5128247 A		07-07-1992
		AU 6432490 A		03-04-1991
		CA 2064068 A		15-02-1991
		EP 0487646 A		03-06-1992

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 5200/00/W0-K	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP00/00564	International filing date (day/month/year) 26 January 2000 (26.01.00)	Priority date (day/month/year) 29 January 1999 (29.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07H 1/08, C12N 15/10, A61K 31/70		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 24 May 2000 (24.05.00)	Date of completion of this report 14 May 2001 (14.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/00564

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

 the international application as originally filed the description:

pages \_\_\_\_\_ 1-9 \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the claims:

pages \_\_\_\_\_ 1-16 \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19)

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the drawings:

pages \_\_\_\_\_ 1/1 \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

## 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4.  The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9, 13-15	YES
	Claims	10-12, 16 (see below)	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9, 13-15	YES
	Claims	10-12, 16 (see below)	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

The following documents are considered to be the closest prior art:

D1 WO-A-95/21177

D2 Nucleic Acids Research; 1994, pages 1774-1775  
(enclosed).

1. Novelty (PCT Article 33(2))

I.

Claims 10-12 refer to the end products of the claimed isolating/ cleaning method.

In a later European phase the end product (per se) has to be novel and inventive - the manufacture is history and therefore irrelevant.

The examiner assumes that a similar level of purity could be achieved already in the prior art (although, perhaps with more complicated methods).

See also the decision T205/83 relating to purity.

II.

Claims 1 to 9 and 13 to 15 are novel over the prior art; the distinguishing feature in relation to D1 is the

absence of a detergent (SDS) in the alcohol solution (isopropanol).

III.

Claim 16 is only characterised by the use of potassium acetate; the use of potassium acetate for cleaning nucleic acids (e.g. plasmids) is already known from the prior art (inter alia D1).

IV.

The priority document is identical to the application documents; the "P" document cited is therefore not considered to be the closest prior art.

2. Inventive step (PCT Article 33(3))

The distinguishing results when using isopropanol with SDS (according to the invention) and without SDS (known) are illustrated in Figure 1; this advantageous effect of the detergent cannot be deduced from the prior art.

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1.

The assertion on page 3, fourth sentence: "...particularly advantageous...one or more ionic detergents..." gives the impression that the detergent (one) does not necessarily have to be present.

Adapting to the claims is required [also because of novelty].

2.

D2 introduced by the examiner describes a cleaning method (of DNA), in which isopropanol, SDS and NaI are used. Although the chaotropic salt is not required within the meaning of the present application (page 4, lines 6-7), the claims do not exclude its presence. The applicant should consider whether the use of a disclaimer (clarification that no chaotropic substance is added) might be advisable.

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5200/00/W0- Koe	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00564	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 26/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 29/01/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07H1/08		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p>		

Datum der Einreichung des Antrags 24/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 14.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt - Gitschiner Str. 103 D-10958 Berlin Tel. +49 30 25901 - 0 Fax: +49 30 25901 - 840	Bevollmächtigter Bediensteter Korsner, S-E Tel. Nr. +49 30 25901 329



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00564

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17): Beschreibung, Seiten:*

1-9 ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-16 ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00564

Beschreibung, Seiten:  
 Ansprüche, Nr.:  
 Zeichnungen, Blatt:

5.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-9, 13-15 Nein: Ansprüche 10-12, 16 (siehe unten)
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-9, 13-15 Nein: Ansprüche 10-12, 16 (siehe unten)
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-16 Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
siehe Beiblatt

## V. Begründete Feststellung

Die folgenden Dokumente werden als nächstliegender Stand der Technik angesehen:

D1 = WO - A - 9521177

D2 = Nucleic Acids Research; 1994, Seiten 1774-1775 (beigelegt)

### 1. Neuheit (Artikel 33(2) PCT)

I.

Die Ansprüche 10-12 beziehen sich auf die Endprodukte des beanspruchten Isolierungs-/Reinigungsverfahrens.

In einer späteren europäischen Phase muß ein Endprodukt (per se) neu und erfinderisch sein - die Herstellung ist Geschichte und deshalb irrelevant.

Es wird vom Prüfer angenommen, daß eine ähnliche Reinheit schon im Stande der Technik erreichbar war (obwohl, vielleicht, mit aufwendigeren Methoden).

Siehe auch die Entscheidung T205/83 betreffend Reinheit.

II.

Die Ansprüche 1-9 und 13-15 sind neu im Hinblick auf den Stand der Technik; das unterscheidende Merkmal gegenüber D1 ist die Anwesenheit eines Detergents (SDS) in der Alkohollösung (Isopropanol).

III.

Anspruch 16 ist nur durch die Verwendung von Kaliumacetat gekennzeichnet; die Verwendung von Kaliumacetat zur Reinigung von Nukleinsäuren (z.B. Plasmide) ist jedoch aus dem Stand der Technik (u.a. D1) schon bekannt.

IV.

Das Prioritätsdokument ist mit den Anmeldungsunterlagen identisch; das zitierte P-Dokument wird somit nicht als nächstliegender Stand der Technik betrachtet.

**2. Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT)**

Die unterschiedenden Ergebnisse bei Verwendung von Isopropanol mit SDS (erfindungsgemäß) und ohne SDS (bekannt) ist in der Abbildung 1 illustriert; diese vorteilhafte Einwirkung des Detergents ist nicht aus dem Stande der Technik entnehmbar.

**VIII. Besondere Bemerkungen**

1.

Die Behauptung auf Seite 3, vierter Satz: "...besonders vorteilhaft...ein oder mehrere ionische Detergenzien..." gibt den Eindruck, daß die Detergents(ein) nicht unbedingt anwesend sein müssen.

Eine Anpassung an die Ansprüche ist notwendig [auch der Neuheit wegen].

2.

Das vom Prüfer eingeführte Dokument D2 beschreibt ein Reinigungsverfahren (von DNA), wobei Isopropanol, SDS und NaI verwendet werden. Obwohl auf das chaotrope Salz im Sinn der vorliegenden Anmeldung verzichtet wird (Seite 4, Zeile 6-7), schließen die Ansprüche nicht seine Anwesenheit aus. Es sollte überlegt werden, ob die Verwendung eines Disclaimers (Klarstellung, daß keine chaotropen Substanz zugegeben wird), zweckmäßig sein könnte.

- - - -

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 17 MAY 2001

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5200/00/W0- Koe	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00564	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/01/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 29/01/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07H1/08		
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.
3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
  - I  Grundlage des Berichts
  - II  Priorität
  - III  Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
  - IV  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
  - V  Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
  - VI  Bestimmte angeführte Unterlagen
  - VII  Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
  - VIII  Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 24/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 14.05.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt - Gitschiner Str. 103 D-10958 Berlin Tel. +49 30 25901 - 0 Fax: +49 30 25901 - 840	Bevollmächtigter Bediensteter Korsner, S-E Tel. Nr. +49 30 25901 329



# INTERNATIONALER VORLAUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00564

## I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-9 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-16 ursprüngliche Fassung

### Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

# INTERNATIONALER VORLAUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/00564

Beschreibung, Seiten:  
 Ansprüche, Nr.:  
 Zeichnungen, Blatt:

5.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-9, 13-15
	Nein: Ansprüche	10-12, 16 (siehe unten)
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-9, 13-15
	Nein: Ansprüche	10-12, 16 (siehe unten)
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

### 2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
siehe Beiblatt

**V. Begründete Feststellung**

Die folgenden Dokumente werden als nächstliegender Stand der Technik angesehen:

D1 = WO - A - 9521177

D2 = Nucleic Acids Research; 1994, Seiten 1774-1775 (beigelegt)

**1. Neuheit (Artikel 33(2) PCT)**

I.

Die Ansprüche 10-12 beziehen sich auf die Endprodukte des beanspruchten Isolierungs-/Reinigungsverfahrens.

In einer späteren europäischen Phase muß ein Endprodukt (per se) neu und erfinderisch sein - die Herstellung ist Geschichte und deshalb irrelevant.

Es wird vom Prüfer angenommen, daß eine ähnliche Reinheit schon im Stande der Technik erreichbar war (obwohl, vielleicht, mit aufwendigeren Methoden). Siehe auch die Entscheidung T205/83 betreffend Reinheit.

II.

Die Ansprüche 1-9 und 13-15 sind neu im Hinblick auf den Stand der Technik; das unterscheidende Merkmal gegenüber D1 ist die Anwesenheit eines Detergents (SDS) in der Alkohollösung (Isopropanol).

III.

Anspruch 16 ist nur durch die Verwendung von Kaliumacetat gekennzeichnet; die Verwendung von Kaliumacetat zur Reinigung von Nukleinsäuren (z.B. Plasmide) ist jedoch aus dem Stand der Technik (u.a. D1) schon bekannt.

**IV.**

Das Prioritätsdokument ist mit den Anmeldungsunterlagen identisch; das zitierte P-Dokument wird somit nicht als nächstliegender Stand der Technik betrachtet.

**2. Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT)**

Die unterschiedenden Ergebnisse bei Verwendung von Isopropanol mit SDS (erfindungsgemäß) und ohne SDS (bekannt) ist in der Abbildung 1 illustriert; diese vorteilhafte Einwirkung des Detergents ist nicht aus dem Stande der Technik entnehmbar.

**VIII. Besondere Bemerkungen**

**1.**

Die Behauptung auf Seite 3, vierter Satz: "...besonders vorteilhaft...ein oder mehrere ionische Detergentien..." gibt den Eindruck, daß die Detergents(ein) nicht unbedingt anwesend sein müssen.

Eine Anpassung an die Ansprüche ist notwendig [auch der Neuheit wegen].

**2.**

Das vom Prüfer eingeführte Dokument D2 beschreibt ein Reinigungsverfahren (von DNA), wobei Isopropanol, SDS und NaI verwendet werden.

Obwohl auf das chaotrope Salz im Sinn der vorliegenden Anmeldung verzichtet wird (Seite 4, Zeile 6-7), schließen die Ansprüche nicht seine Anwesenheit aus. Es sollte überlegt werden, ob die Verwendung eines Disclaimers (Klarstellung, daß keine chaotropen Substanz zugegeben wird), zweckmäßig sein könnte.

-----

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 5200/00/W0- K	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP00/00564	International filing date (day/month/year) 26 January 2000 (26.01.00)	Priority date (day/month/year) 29 January 1999 (29.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07H 1/08, C12N 15/10, A61K 31/70		
Applicant ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 24 May 2000 (24.05.00)	Date of completion of this report 14 May 2001 (14.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/00564

## I. Basis of the report

## 1. With regard to the elements of the international application:\*

the international application as originally filed

the description:

pages \_\_\_\_\_ 1-9 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_ , filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_ , filed with the letter of \_\_\_\_\_

the claims:

pages \_\_\_\_\_ 1-16 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_ , as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_ , filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_ , filed with the letter of \_\_\_\_\_

the drawings:

pages \_\_\_\_\_ 1/1 \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_ , filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_ , filed with the letter of \_\_\_\_\_

the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_ , as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_ , filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_ , filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.  
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).  
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).  
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

## 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.  
 filed together with the international application in computer readable form.  
 furnished subsequently to this Authority in written form.  
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.  
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.  
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4.  The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_  
 the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
 the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 00/00564

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9, 13-15	YES
	Claims	10-12, 16 (see below)	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9, 13-15	YES
	Claims	10-12, 16 (see below)	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

The following documents are considered to be the closest prior art:

D1 WO-A-95/21177

D2 Nucleic Acids Research; 1994, pages 1774-1775  
(enclosed).

1. Novelty (PCT Article 33(2))

## I.

Claims 10-12 refer to the end products of the claimed isolating/ cleaning method.

In a later European phase the end product (per se) has to be novel and inventive - the manufacture is history and therefore irrelevant.

The examiner assumes that a similar level of purity could be achieved already in the prior art (although, perhaps with more complicated methods).

See also the decision T205/83 relating to purity.

## II.

Claims 1 to 9 and 13 to 15 are novel over the prior art; the distinguishing feature in relation to D1 is the

absence of a detergent (SDS) in the alcohol solution (isopropanol).

III.

Claim 16 is only characterised by the use of potassium acetate; the use of potassium acetate for cleaning nucleic acids (e.g. plasmids) is already known from the prior art (inter alia D1).

IV.

The priority document is identical to the application documents; the "P" document cited is therefore not considered to be the closest prior art.

2. Inventive step (PCT Article 33(3))

The distinguishing results when using isopropanol with SDS (according to the invention) and without SDS (known) are illustrated in Figure 1; this advantageous effect of the detergent cannot be deduced from the prior art.

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1.

The assertion on page 3, fourth sentence: "...particularly advantageous...one or more ionic detergents..." gives the impression that the detergent (one) does not necessarily have to be present.

Adapting to the claims is required [also because of novelty].

2.

D2 introduced by the examiner describes a cleaning method (of DNA), in which isopropanol, SDS and NaI are used. Although the chaotropic salt is not required within the meaning of the present application (page 4, lines 6-7), the claims do not exclude its presence. The applicant should consider whether the use of a disclaimer (clarification that no chaotropic substance is added) might be advisable.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :  C07H 1/08, 21/00, C12N 15/10, C12P 19/34		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/21178  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 1995 (10.08.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/00390  (22) Internationales Anmeldedatum: 3. Februar 1995 (03.02.95)		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten:  P 44 03 692.2 7. Februar 1994 (07.02.94) DE P 44 03 693.0 7. Februar 1994 (07.02.94) DE P 44 31 125.7 1. September 1994 (01.09.94) DE P 44 32 654.8 14. September 1994 (14.09.94) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4, D-40724 Hilden (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): COLPAN, Metin [TR/DE]; Uhlandstrasse 5, D-45219 Essen (DE). SCHORR, Joachim [DE/DE]; An der Schützenwiese 43, D-40231 Düsseldorf (DE).			
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).			
<p>(54) Title: NUCLEIC ACID TRANSFECTION EFFICIENCY INCREASE BY USE OF ISOPROPANOL IN AQUEOUS SOLUTIONS</p> <p>(54) Bezeichnung: STEIGERUNG DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ VON NUCLEINSÄUREN DURCH DIE VERWENDUNG VON ISOPROPANOL IN WÄSSRIGEN LÖSUNGEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Isopropanol in aqueous solutions is used for chromatographically isolating nucleic acids and for increasing the transfection efficiency of the isolated nucleic acids in prokaryotic and eukaryotic cells.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Verwendung von Isopropanol in wässrigen Lösungen für die chromatographische Isolierung von Nucleinsäuren zur Steigerung der Transfektionseffizienz der isolierten Nucleinsäuren in pro- und eukaryontischen Zellen.</p>			

Steigerung der Transfektionseffizienz von Nucleinsäuren durch die Verwendung von Isopropanol in wäßrigen Lösungen

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von Isopropanol in wäßrigen Lösungen zur Steigerung der Transfektionseffizienz von Nucleinsäuren in pro- und eukaryontischen Zellen.

Die DE 36 39 949 A1 der Anmelderin betrifft ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren, insbesondere langkettiger Nucleinsäuren. Dabei werden wäßrige Lösungen (Puffer) relativ niedriger Ionenstärke verwendet, um die zunächst bei niedriger Ionenstärke an einer Anionenaustauschermatrix adsorbierten Nucleinsäure zu waschen. Danach werden die Nucleinsäuren mit Puffern höherer Ionenstärke von der Matrix desorbiert. Ethanol kann dabei unter anderem zur Präzipitation von Nucleinsäuren, insbesondere DNA, eingesetzt werden. Niedere Alkohole enthaltende Lösungen werden in der P 43 21 904 der Anmelderin vorgeschlagen. Hierbei werden die niedere aliphatische Alkohole enthaltenden Lösungen in Zusammenwirkung mit chaotropen Ionen hoher Konzentration verwendet, um Nucleinsäuren an nicht mit Anionenaustauschergruppen modifizierten anorganischen Materialien zu adsorbieren.

In einer bevorzugten Verwendungsform wird dabei das Isopropanol in einer Menge von 1 - 50 Vol.-%, insbesondere 5 - 25 Vol.-%, besonders bevorzugt von 10 bis 15 Vol.-%, in den wäßrigen Lösungen vorliegen. Dabei können die wäßrigen Lösungen insbesondere auch für Anionenaustauscher übliche chromatographische Salze mono- oder divalenter Kationen, wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid, etc. oder Kombinationen davon, enthalten. Die wäßrigen Lösungen sind vorzugsweise mit in der Molekularbiologie gebräuchlichen Puffersubstanzen, wie TRIS/HCl, MOPS, etc., gepuffert und weisen pH-Werte zwischen 6 und 9 auf.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Isopropanols lässt sich insbesondere bei der Isolation von DNA, wie Plasmid-DNA, anwenden, ist jedoch nicht auf diese DNA-Arten beschränkt.

Die unter erfindungsgemäßer Verwendung von Isopropanol erhaltenen Nucleinsäuren sind insbesondere für den Einsatz in gentherapeutischen Verfahren geeignet.

Erfindungsgemäß werden ebenfalls Lösungen beansprucht, die Isopropanol in Mengen von 5 bis 60 Vol.-% enthalten können. Dies sind insbesondere die Waschpuffer, die gemäß DE 39 949 A1 eingesetzt werden können. Diese Puffer enthalten 0,5 bis 1,5 M Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, 20 bis 80 mM MOPS oder TRIS/HCl bei einem pH-Wert von 6 bis 8. Erfindungsgemäß ebenfalls beansprucht werden wäßrige Lösungen unter Verwendung von 5 bis 60 Vol.-% Isopropanol enthaltend darüber hinaus 1,0 bis 2,0 M Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, 20 bis 80 mM TRIS/HCl bei einem pH-Wert von 8 bis 9.

Die DE 39 13 814 A1 beschreibt in allgemeiner Form wäßrige Systeme in Puffern, die zur Elektroelution von Gelen verwendet werden können. Die dort beschriebenen Puffersysteme weisen beispielsweise Natriumchlorid, Puffersalze, wie MOPS, und niedere Alkohole, insbesondere C1 bis C4-Alkohole, auf.

- 5 -

Beispiel 1

Als Nucleinsäuren wurden im folgenden Plasmid-DNA aus *E. coli* analog dem in DE 36 39 949 A1 genannten Verfahren getrennt und isoliert. Dabei wird die Nucleinsäure an dem in der DE 36 39 949 A1 beschriebenen Anionenaustauschermaterial (QIAGEN®, Diagen GmbH, Deutschland) adsorbiert. Es wurde mit einem Puffer der Zusammensetzung 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Isopropanol, pH 7,0 gewaschen. Danach wurde die Plasmid-DNA mit dem isopropanolhaltigen Puffer der Zusammensetzung 1,25 M NaCl, 50 mM TRIS/HCl, 15 Vol.-% Isopropanol, pH 8,5 eluiert.

Dabei zeigte sich, daß die Ausbeute von Plasmid-DNA aus *E. coli* gegenüber der bekannten Präparation unter Verwendung von Ethanol um ca. 10% gesteigert werden konnte.

Mit der so erhaltenen DNA wurden dann Transfektionsexperimente durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde über die Messung der lacZ-Aktivität bestimmt, wobei NIH 3T3-Zellen verwendet wurden. Diese Zellen wurden mit Hilfe der Kalziumphosphatmethode (Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973) "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", *Virology* 52: 456 - 467) mit 1 µg des Reporterkonstrukts pRSVlacZ transfiziert (Lucibello, F. c. and R. Müller (1989) "Sensitive microscale assay for the analysis of promotor activity in eukaryotic cells", *Methods Mol. Biol.* 1: 9 - 18).

Die Tabelle zeigt die Transfektionseffizienz bei Verwendung verschiedener Alkohole, Ethanol reinst und vergällt, Isopropanol und n-Butanol.

A n s p r ü c h e

1. Verwendung von Isopropanol in wäßrigen Lösungen für die chromatographische Isolierung von Nucleinsäuren zur Steigerung der Transfektionseffizienz der isolierten Nucleinsäuren in pro- und eukaryontischen Zellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Isopropanol in Mengen von 1 bis 50 Vol.-% in den wäßrigen Lösungen vorliegt.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Isopropanol in Mengen von 5 - 25 Vol.-% in den wäßrigen Lösungen vorliegt.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Isopropanol in Mengen von 10 - 15 Vol.-% in den wäßrigen Lösungen vorliegt.
5. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die wäßrige Lösung für die Anionenaustauscher-Chromatographie übliche Salze mono- oder divalenter Kationen, wie Natriumchlorid, Kalziumchlorid, Kaliumchlorid, etc., enthält.
6. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die wäßrige Lösung eine gepufferte Lösung ist.
7. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Nucleinsäure-DNA Plasmid-DNA ist.
8. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, zur Herstellung von Nucleinsäuren für die Gentherapie.
9. Wäßrige Lösung enthaltend 0,5 bis 1,5 M Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, 10 bis 100 mM MOPS oder TRIS/HCl

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No  
PCT/EP 95/00390A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07H1/08 C07H21/00 C12N15/10 C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07H C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 512 767 (BECTON, DICKINSON & COMPANY) 11 November 1992 see page 3, line 41 - line 45 ----	1-4,7,8
X	EP,A,0 512 768 (BECTON, DICKINSON & COMPANY) 11 November 1992 see page 3, line 39 - line 43 ----	1-4,7,8
P,X	DE,A,43 21 904 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 12 January 1995 see examples ----	1-4,6-8
X	WO,A,93 11221 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10 June 1993 see the whole document -----	1-8

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

'&' document member of the same patent family

1	Date of the actual completion of the international search  4 July 1995	Date of mailing of the international search report  11.07.95
	Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Day, G

Form PCT/ISA/310 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen  
PCT/EP 95/00390

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes  
IPK 6 C07H1/08 C07H21/00 C12N15/10 C12P19/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 C07H C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 512 767 (BECTON, DICKINSON & COMPANY) 11.November 1992 siehe Seite 3, Zeile 41 - Zeile 45 ---	1-4,7,8
X	EP,A,0 512 768 (BECTON, DICKINSON & COMPANY) 11.November 1992 siehe Seite 3, Zeile 39 - Zeile 43 ---	1-4,7,8
P,X	DE,A,43 21 904 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 12.Januar 1995 siehe Beispiele ---	1-4,6-8
X	WO,A,93 11221 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10.Juni 1993 siehe das ganze Dokument -----	1-8

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  4.Juli 1995	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  11.07.95
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Day, G

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESES**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>5200/00/W0- K</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des Internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 00/ 00564</b>	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) <b>26/01/2000</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>29/01/1999</b>
Anmelder		
<b>ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.</b>		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der Sprache ist die Internationale Recherche auf der Grundlage der Internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der Internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der Internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die Internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der Internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der Internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der Internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3.  Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG ENDOTOXINFREIER NUKLEINSÄUREN UND DEREN VERWENDUNG**

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses Internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

**6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_**

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet

keine der Abb.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00564

A. KLASSEIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07H1/08 C12N15/10 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 7 C07H C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PRAZERES D M F ET AL: "Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, Bd. 806, Nr. 1, 8. Mai 1998 (1998-05-08), Seiten 31-45, XP004121166 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-5, 8, 10-12, 16

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

28. April 2000

10/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scott, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEVISON P R ET AL: "New approaches to the isolation of DNA by ion-exchange chromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, Bd. 827, Nr. 2, 11. Dezember 1998 (1998-12-11), Seiten 337-344, XP004153868 ISSN: 0021-9673 Zusammenfassung Seite 338, Spalte 2, Zeile 14 -Seite 339, Spalte 2, Zeile 42 ----	1-5, 8, 10-12, 16
A	WO 95 21179 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); MORITZ PETER (DE); SCHORR JOACHIM) 10. August 1995 (1995-08-10) Ansprüche 1,7; Beispiele 1,2 ----	1, 11-13, 16
X	WO 95 21178 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); SCHORR JOACHIM (DE)) 10. August 1995 (1995-08-10) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-10; Beispiele 1,2 ----	10
A	WO 95 21177 A (QIAGEN GMBH ;COLPAN METIN (DE); MORITZ PETER (DE); SCHORR JOACHIM) 10. August 1995 (1995-08-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1, 11-13, 16
A	WO 93 08894 A (COULTER CORP) 13. Mai 1993 (1993-05-13) das ganze Dokument ----	1, 11-13, 16
X	WO 89 07603 A (MEMORIAL BLOOD CENTER OF MINNE) 24. August 1989 (1989-08-24) Seite 1, Zeile 1 -Seite 2, Zeile 17 Seite 8, Zeile 1 -Seite 10, Zeile 34; Ansprüche 1-17 ----	10
A	US 4 833 239 A (RIEDEL GERARD E ET AL) 23. Mai 1989 (1989-05-23) Anspruch 1 ----	1, 10-13, 16
A	WO 91 02740 A (UNIV TEXAS) 7. März 1991 (1991-03-07) Seite 8, Zeile 8 - Zeile 35; Ansprüche 1,16-20,24,33; Beispiel 1 ----	1, 10-13, 16
		-/-

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00564

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LEVISON P R ET AL: "Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, Bd. 816, Nr. 1, 7. August 1998 (1998-08-07), Seiten 107-111, XP004145838 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument -----	1, 10-13, 16
P, X	PRAZERES D M F ET AL: "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, NL, ELSEVIER, AMSTERDAM, Bd. 17, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 169-174, XP004162836 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument -----	1, 2, 10, 12, 16

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)Date of mailing (day/month/year)  
01 novembre 2001 (01.11.01)Applicant's or agent's file reference  
5200/00/W0-KInternational application No.  
PCT/EP00/00564

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

WEISS, W.  
Weickmann & Weickmann  
Postfach 860 820  
81635 München  
ALLEMAGNETELEFAX CENTER 1600/2900  
MAR 11 2002  
RECEIVED

## IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)  
26 janvier 2000 (26.01.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

 the applicant  the inventor  the agent  the common representative

## Name and Address

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH  
Patentabteilung  
D-68298 Mannheim  
Germany

## State of Nationality

## State of Residence

## Telephone No.

0621/759-3277

## Facsimile No.

0621/759-4457

## Teleprinter No.

2. The international Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

 the person  the name  the address  the nationality  the residence

## Name and Address

WEISS, W.  
Weickmann & Weickmann  
Postfach 860 820  
81635 München  
Germany

## State of Nationality

## State of Residence

## Telephone No.

089/45563 0

## Facsimile No.

089/45563 999

## Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

 the receiving Office the designated Offices concerned the International Searching Authority the elected Offices concerned the International Preliminary Examining Authority other:The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Ingrid AULICH

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 03 August 2000 (03.08.00)	
International application No.: PCT/EP00/00564	Applicant's or agent's file reference: 5200/00/W0- K
International filing date: 26 January 2000 (26.01.00)	Priority date: 29 January 1999 (29.01.99)
Applicant: GRIMM, Stefan et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
24 May 2000 (24.05.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---